Thesis TUBINGEN 1967

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Doppelbrechende Granula in Vorstufen roter und weißer Blutzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
WALTER EBNER
aus Altshausen (Württ.)

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA

9192

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr.med. H.E. Bock

DOPPELBRECHENDE GRANULA IN VORSTUFEN ROTER UND WEISSER BLUTZELLEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Walter E b n e r
aus Altshausen (Württ.)

D e k a n : Professor Dr.med. F. L e m b e c k

1. Berichterstatter: Professor Dr.med. H.P. M i ß m a h l

2. Berichterstatter: Professor Dr.med. H.E. B o c k

Herrn Professor Mißmahl möchte ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit danken.

Inhaltsübersicht.

Seite

Einleitung 1

Material und Methodik

I Das Färbeverfahren und die Herstellung der Präparate 4

II 1. Methode: Zahlenmäßiger Vergleich mit einer bekannten Färbung 5

III 2. Methode: Markierung einer unbekannten Zelle u. Umfärbung auf eine bekannte Färbung .. 6

IV 3. Methode: Ausnutzung charakteristischer Blutbildveränderungen bei bestimmten Krankheiten 9

V Grundsätzliches zur Toluidinblaufärbung .. 13

Ergebnisse

I Die Beschreibung der weißen Vorstufen ... 17

1. Die Myeloblasten: 17

2. Die Promyelozyten und Myelozyten 21

3. Die basophilen Myelozyten 27

4. Die Jugendlichen 31

II Die Beschreibung der roten Vorstufen 32

1. Die Normoblasten 33

2. Die Erythroblasten 35

3. Die Megaloblasten 35

4. Lysosomen 37

Diskussion der Ergebnisse .. 39

Zusammenfassung 44

Literatur 46

Einleitung:

Mit dem Farbstoff Toluidinblau lassen sich Leukozyten in frisch entnommenem menschlichen Venenblut supravital anfärben. Ist der Farbstoff im Überschuß vorhanden, so erscheinen die Zellkerne dabei kräftig blau, während das Protoplasma weniger angefärbt ist.

Bei polarisationsoptischen Untersuchungen dieser Färbung wurden von M i s s m a h l (29) im Protoplasma der granulierten Leukozyten, der Lymphozyten und der Monozyten hell aufleuchtende doppelbrechende Strukturen gefunden. Es handelt sich bei diesen Strukturen um Teile des Protoplasmas, die feinstrukturell aus übereinanderliegenden Kugelschalen aufgebaut sind. In diese Kugelschalen ist der Farbstoff - mit der längeren Achse seiner Teilchen senkrecht zu den Radien stehend - eingelagert. Nach Größe und Stärke der Anisotropie wurden die Teilchen in "kleine", "mittlere" und "große" eingeteilt (15, 29). Die kleinen davon sind zwischen gekreuzten Polars als feine, gelblich aufleuchtende Pünktchen eben noch sichtbar. Im Hellfeld lassen sie sich nicht erkennen. Die mittleren erreichen den Durchmesser der neutrophilen Granula, sind mit diesen aber nicht identisch. Sie geben zwischen gekreuzten Polars gelb-rötliche, anomale Polarisationsfarbe. Im Hellfeld erscheinen sie blau. Die Polarisationsfarbe der großen doppelbrechenden Strukturen entspricht jener der mittleren, sie zeichnen sich aber dadurch aus, daß in ihnen ein Polarisationskreuz zu erkennen ist.

Die Anzahl und Verteilung dieser doppelbrechenden Strukturen ist von Zellart zu Zellart verschieden.

Bei den neutrophilen Granulozyten des Menschen ließen sich folgende Merkmale erkennen:

1. Für den gesunden Menschen konnten Normwerte aufgestellt werden. Es überwiegen dort die feinen und mittleren Strukturen (38).

2. Bei akuten Entzündungen, bei Fieber und nach Injektion pyrogener Stoffe konnte eine Abnahme der feinen und mittleren doppelbrechenden Strukturen zugunsten der großen beobachtet werden (38).
3. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Doppelbrechung und der Kernsegmentzahl der neutrophilen Granulozyten insofern, als die großen Strukturen mit steigender Anzahl der Kernsegmente abnehmen (38).
4. Mit zunehmender Färbedauer nehmen die feinen und mittleren Strukturen zugunsten der großen ab (29,38).
5. Nach Zytostatikagabe ist nach einigen Tagen eine charakteristische Zunahme der Doppelbrechung zu verzeichnen (25).

L e m k e (25) variierte die von M i s s m a h l angegebene Einteilung der Doppelbrechung. Er versteht unter "grob" nicht ausschließlich solche Strukturen, die ein Polarisationskreuz erkennen lassen, sondern zählt darunter auch jene Strukturen, die - zwar ohne deutlich ausgebildetes Polarisationskreuz - doch dieselbe Größe und Helligkeit wie Polarisationskreuze aufweisen.
In den folgenden Untersuchungen wurde die von L e m k e beschriebene, hier nochmals zusammengefaßte Einteilung benutzt:

"fein": kaum sichtbare, staubfeine doppelbrechende Strukturen.

"mittel": gut sichtbare doppelbrechende Strukturen in Größe der neutrophilen Granula.

"grob 1-3": große doppelbrechende Strukturen, die durch ein schwarzes Polarisationskreuz auf weißem Grund ausgezeichnet sind, und solche Strukturen, die zwar kein deutlich ausgebildetes Polarisationskreuz haben, jedoch dieselbe Größe und Helligkeit wie diese aufweisen.

"grob mehr als 3": mehr als 3 der unter "grob 1-3" beschriebenen Strukturen (25).

Um größere Zellgruppen bezüglich des Ausmaßes ihrer Gesamtdoppelbrechung beurteilen zu können, führte S c h m i d (38) einen Index ein, welcher ein Maß für die durchschnittliche Doppelbrechungsstärke der Einzelzellen einer Zellgruppe angibt. Zur Bestimmung von diesem Doppelbrechungsindex für eine zu bewertende Gruppe von Zellen, beziehungsweise einer Zellart, deren Einzeldoppelbrechungen nach dem geschilderten Schema differenziert wurden, wird allen Zellen mit der Doppelbrechungsqualität "klein" der Wert 1, denjenigen der Qualität "mittel" der Wert 2, denjenigen der Qualität "groß" der Wert 3 und den Zellen mit der Doppelbrechungsqualität "groß mehr als 3" der Wert 4 zugeordnet. Die Summe all dieser Werte dividiert durch die Anzahl der berücksichtigten Zellen ergibt einen in seiner Größe vom Ausmaß der durchschnittlichen Doppelbrechung abhängigen Wert größer als 1.

Die hier beschriebenen Untersuchungen hatten folgendes Ziel: Lassen sich in Ausstrichen von Leukämie-Blut, das supravital mit Toluidinblau gefärbt wurde und in Ausstrichen von Knochenmarkspunktaten, die auf dieselbe Weise gefärbt wurden, die zu erwartenden roten und weißen Vorstufen erkennen und beschreiben? Lassen sich in allen Zellarten doppelbrechende Strukturen nachweisen, und lassen sich von jeder Zellart Normwerte bezüglich der Doppelbrechung aufstellen?

Das Färbeverfahren und die Herstellung der Präparate:

Bei der angewandten Färbemethode handelt es sich um eine Supravitalfärbung der Blutzellen in frisch entnommenem, ungerinnbar gemachtem Venenblut bzw. Knochenmarkspunktat.

a) Venenblut:

Nach der üblichen Art der Blutentnahme für die Blutkörperchensenkungsreaktion werden 1,6 ml Venenblut mit 0,4 ml 3,8 %igem Natriumzitrat vermischt. Sofort nach der Entnahme wird 1 ml dieses Zitratblutes in ein Reagenzglas gebracht und 0,2 ml einer 0,5 %igen wässerigen Toluidinblaulösung dazugegeben. Beide Medien werden vorsichtig durchmischt und für die Dauer einer Stunde in ein Wasserbad mit konstanter Temperatur von 25 C gebracht.
Im Anschluß wird ein Tropfen des gefärbten Zitratblutes auf einen Objektträger gebracht und möglichst sorgfältig, ohne die Zelle zu quetschen, zu einem gleichmäßig dünnen Film ausgestrichen.

b) Knochenmarkspunktat:

Hier stehen nur kleinere und vor allem unterschiedliche Mengen zur Verfügung. Das Mischverhältnis bleibt, während die absoluten Zahlen schwanken. Stehen z. B. 0,4 ml Knochenmarkspunktat zur Verfügung, so zieht man mit 0,1 ml Natriumzitrat auf und gibt dann 0,1 ml Toluidinblau dazu. Der weitere Verlauf ist derselbe.
Die Ausstriche werden an der Luft getrocknet.

Ein technischer Hinweis:

Ein Ausstrich des mit Toluidinblau gefärbten Blutes oder Knochenmarkes ist nach dem Ausstreichen in wenigen Sekunden getrocknet. Man kann ihn deswegen sofort unter dem Mikroskop anschauen, beurteilen, ob er zu dünn oder zu dick ausgestrichen ist, und sich bei der Anfertigung der weiteren Präparate danach richten. Das lohnt sich vor allem, wenn die Leukozytenzahl vor dem Ausstreichen nicht bekannt ist.
Zur Betrachtung der Ausstrichpräparate wurde ein Polarisationsmikroskop mit einem Ölimmersionsobjektiv (Fl Oel

95/133 Leitz) benützt. Als Lichtquelle diente eine sehr helle Mikroskopierlampe (6v), um trotz gekreuzter Polarisationsfilter ein gut erleuchtetes Gesichtsfeld zu haben.

Methodik:

Es wurden 3 Methoden benützt, um die Vorstufen der roten und weißen Blutzellen erkennen und beschreiben zu können.

1. Methode: Zahlenmäßiger Vergleich mit einer bekannten Färbung.

Von dem frisch abgenommenen Zitratblut wurden - vor der Zugabe von Toluidinblau - einige Ausstriche angefertigt, nach Pappenheim gefärbt und ausgezählt. Bei Blut von Leukämien wurden 400 und bei Sternalpunktaten 600 Zellen der weißen Reihe ausgezählt. Bei den beiden Färbemethoden muß sich das Verhältnis der einzelnen Zellen zueinander annähernd entsprechen. Werden zum Beispiel bei der Färbung nach Pappenheim 10 % Myeloblasten, 40 % Myelozyten und 50 % Segmentkernige gefunden, bei der Färbung mit Toluidinblau jedoch 3 verschiedene Zellarten: A, B, C und zwar A zu 10 %, B zu 40 % und C zu 50 % vorgefunden, so ist anzunehmen, daß die Zellart A den Myeloblasten, die Zellart B den Myelozyten und die Zellart C den Segmentkernigen entspricht.

Diese Methode birgt mit steigender Zahl verschiedener Zellen einen größeren Unsicherheitsfaktor. Sie wird weiterhin desto ungenauer, je mehr Zellen sich bei der Färbung nach Pappenheim finden, die sich nicht einordnen lassen, da ja bei der Färbung mit Toluidinblau zunächst alle Vorstufen nicht einzuordnen waren.

Weitere methodische Fehler ergeben sich, wenn bei einer Färbemethode eine Zellart bevorzugt zu Grunde geht, oder sich schlecht anfärbt, so daß sie leicht übersehen wird, oder wenn 2 verschiedene Zellarten sich bei einer Färbemethode nicht unterscheiden lassen. Es mußte tatsächlich festgestellt werden, daß die Lymphozyten bei der Färbung mit Toluidinblau besonders schnell zu Grunde gehen.

Sind die Lymphozyten vermehrt, wie zum Beispiel beim Pfeiffer'schen Drüsenfieber oder der Lymphadenose, so liegen nahezu alle Lymhozyten (und Monozyten) in defektem Zustande vor. Bei einer Paramyeloblastemleukämie sind nun ungünstigerweise auch fast alle Blasten defekt. Während sich nun defekte Lymphozyten von defekten Segmentkernigen durchaus unterscheiden lassen, kann man defekte Paramyeloblasten nicht sicher von defekten Lymphozyten unterscheiden.
Diese Methode hat sich also nur als bedingt brauchbar erwiesen. So wurde sie nur noch als zusätzliche Kontrolle benutzt. Wurden zum Beispiel bei einer Thalassämia major im Differentialblutbild bei der Färbung nach Pappenheim 10% Lymphozyten und 20% Normoblasten, bei der Färbung mit Toluidinblau jedoch 20% Lymphozyten und 10% Normoblasten ausgezählt, so war daraus zu schließen, daß die erarbeiteten Kriterien zur differentialdiagnostischen Unterscheidung von Lymphozyten und Normoblasten bei der Färbung mit Toluidinblau noch nicht ausreichend waren.

2. Methode: Markierung einer unbekannten Zelle und Umfärbung auf eine bekannte Färbung.

Diese Methode ist außerordentlich elegant, schnell und sicher. An Stelle eines Objektivs, (das selten benützt wird), wird in den Revolver des Mikroskopes ein Diamantschreiber eingeschraubt. Die unbekannte Zelle, die - mit Hilfe der Umfärbung - identifiziert werden soll, wird genau in die Mitte des Blickfeldes eingestellt. Der Diamantschreiber wird so vorbereitet, daß er einen möglichst kleinen Kreis beschreibt. Der Tubus wird nach unten bewegt, bis der Diamantstift fest auf dem Präparat aufsitzt. Nun wird mit langsamen Drehbewegungen ein Kreis gezogen. Der Diamantstift ritzt in das Glas einen Kreis mit dem Radius von etwa 1/4 mm, der nach der Umfärbung deutlich zu erkennen ist. Ist das Mikroskop zentriert, so findet man die unbekannte, umzufärbende Zelle genau in der Mitte des Kreises.

Gleich anschließend wird noch ein um vieles größerer Kreis um denselben Mittelpunkt beschrieben. Dieser hat lediglich die Aufgabe, den kleinen Kreis zu markieren, da dieser mit dem bloßen Auge oft recht schwer zu erkennen ist. Mit dem 95er Objektiv wird kontrolliert, ob die gewünschte Zelle auch in der Mitte des Kreises ist.
Befinden sich außer der unbekannten Zelle noch andere Zellen im Kreis, so empfiehlt es sich, eine Skizze des Kreises anzufertigen. Aus dieser soll ersichtlich sein, wie die einzelnen Zellen zueinander und vor allem zu der unbekannten Zelle liegen. Das Bild nach der Umfärbung ist so verändert, daß man die Zelle ohne Skizze nicht sicher wiederfindet. Die unbekannte Zelle wird - einschließlich ihrer Doppelbrechung - genau aufgezeichnet. Anschließend wird auf gewohnte Weise, nachdem das Immersionsöl entfernt worden ist, nach Pappenheim gefärbt.
Beim Abspülen mit aqua dest. im Anschluß an die Giemsa-Färbung empfiehlt es sich, den scharfen Strahl nicht direkt auf den Kreis zu richten, da sich sonst leicht ein größerer Teil des Blutfilmes, der ja durch den Kreis unterbrochen ist, vom Glase loslöst. Der Rand des Kreises, der vor der Umfärbung 3-4 Erythrozytendurchmesser dick war, kann nach der Umfärbung fast doppelt so breit geworden sein. Man kann also nicht damit rechnen, daß Zellen, die am Rande des Kreises gelegen waren, nach der Umfärbung noch zu sehen sind. Das Einstellen der nún umgefärbten Zelle geht am schnellsten vor sich, wenn man den großen Kreis mit Hilfe des 10er Objektivs aufsucht.

Nachteil dieser Methode:
Die Ausstriche lassen sich nicht mehr gut umfärben, wenn sie schon zu alt sind. Alle kernhaltigen Zellen werden zu dunkel. Es ist daher am besten, wenn man die Ausstriche möglichst bald, nachdem sie hergestellt worden sind, unter dem Polarisationsmikroskop anschaut, die unbekannten Zellen markiert, Skizzen anfertigt und gleich anschließend umfärbt. Ausstriche, die eine Woche und kürzer gelegen

haben, lassen sich immer gut umfärben; Ausstriche, die einen Monat und älter sind, lassen sich nach der Umfärbung nicht mehr sicher differenzieren. Es empfiehlt sich, immer genügend Toluidinblau-Ausstriche herzustellen, da ja ein einmal umgefärbtes Präparat für die Polarisationsmikroskopie verloren ist.
Toluidinblau-Ausstriche von peripherem Venenblut lassen sich viel besser umfärben als Ausstriche von Knochenmarkspunktaten. Versuche, durch Variieren der Pappenheimfärbung hier zu besseren Ergebnissen zu kommen, sind alle gescheitert.

Diese zweite Methode: "Markierung und Umfärbung auf eine bekannte Färbung" gibt noch zwei interessante Nebenbefunde.
1. Zellen, die unter dem Polarisationsmikroskop reichlich geschädigt aussehen (gelb-grünliche, flächenhafte Doppelbrechung), sehen nach der Umfärbung nur wenig geschädigt aus. Entsprechend sehen Zellen, die unter dem Polarisationsmikroskop nur leicht geschädigt aussehen, nach der Umfärbung noch ganz intakt aus. Das heißt, mit Hilfe der Toluidinblau-Färbung lassen sich Zellschädigungen gut feststellen.
2. Besonders große doppelbrechende Strukturen mit einem Polarisationskreuz lösen sich bei der Umfärbung fast regelmäßig von ihrer Zelle ab. Diese Stelle imponiert danach dann als Vakuole. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf Struktur und Größe dieser großen doppelbrechenden Strukturen ziehen. (Siehe Abb. S.12)

3. Methode: Ausnutzung charakteristischer Blutbildveränderungen bei bestimmten Krankheiten.

Vorstufen roter und weißer Blutzellen sind in Ausstrichen von Knochenmarkspunktaten vorhanden, können aufgesucht und beschrieben werden. Sind jedoch, wie dies zu Beginn der Untersuchungen von mit Toluidinblau gefärbten Ausstrichen der Fall war, fast alle Zellen im knochenmarkspunktat nicht einzuordnen, so bietet sich die Möglichkeit an, auf bestimmte Krankheitsbilder zurückzugreifen; so zum Beispiel auf eine Myeloblastenleukämie mit rund 90% Myeloblasten. Präparate von diesem Krankheitsbild geben mit Sicherheit Aufschluss über das Aussehen der Myeloblasten: die Zellart, die zu 90% vorliegt, entspricht den Myeloblasten. Grundsätzlich sind die Krankheitsbilder am günstigsten, bei denen im Blutbild entweder eine Zellart in einem großen Prozentsatz vorkommt, oder bei denen nur eine beschränkte Anzahl verschiedener Zellarten vorliegt.

So haben zum Beispiel chronische Myelosen weniger verschiedene Zellarten als ein Knochenmarkspunktat und sind deswegen diesem vorzuziehen.
Gewisse Anämien, so zum Beispiel die Thalassämia major, zeigen nur rote und keine, oder nur wenige weiße Vorstufen und bieten sich deshalb zur Erkennung der Normo- und Erythroblasten an.
Zu denken ist in diesem Zusammenhang auch an die Erythroblastose neonatorum bei Rhesus-Inkompatibilität.
U l l r i c h (43) schreibt, daß Normoblasten und Erythroblasten mehr als die Hälfte aller kernhaltigen Blutelemente ausmachen können. Auch das weiße Blutbild weist bei der Erythroblastose neonatorum eine Linksverschiebung, bisweilen bis zu den Myeloblasten auf.
Nach S a l o m o n s e n (37) findet man beim Morbus hämolyticus neonatorum sogar eine Erythroblastose von 10 000 - 400 000 pro mm^3.
Bei Neugeborenen zuckerkranker Mütter findet man bisweilen auch eine Erythroblastose wie beim Morbus hämolyticus

neonatorum. (37)
Grundsätzlich ist beim Blut Neugeborener mit unreifen Blutzellen zu rechnen - aus der weißen wie aus der roten Reihe (37), daneben fällt im Ausstrich, im Vergleich zum Erwachsenen, deutlich eine Makrozytose der Erythrozyten auf. (23)
Bei ABO-Inkompatibilität sind nicht die roten Vorstufen das hämatologische Leitsymptom im Ausstrich, sondern die Kugelzellen. (4)
Neben der Erythroblastose des Neugeborenen findet man auch die Erythroblastosen des Erwachsenenalters, bei denen man nach H e i l m e y e r (20) 4 Formen unterscheidet.
1. Die akute Erythrämie, (Myelosis erythrämica, Malattia Di Guglielmo)
Hier imponiert im Blutbild eine erhebliche normochrome Anämie mit starker Vermehrung unreifer Erythroblasten, in manchen Fällen bis zu 250 000 im mm^3. Sie sind meist basophil oder polychromatisch. Oft fehlt von den unreifen Erythroblasten zu den reifen jeder Übergang, so daß man in Parallelität zum "Hiatus leukämicus" vom "Hiatus erythrämicus" spricht. (Ein Fehlen der Normoblasten wäre ideal zur Erkennung der Erythroblasten. Da sich ja Normo- und Erythroblasten nicht unbedingt an Hand der Größe unterscheiden lassen (5), ist eine Verwechslung leicht möglich, solange nicht zusätzliche Unterscheidungsmerkmale in der Toluidinblau-Färbung gefunden sind.)
Während die kernlosen Erythrozyten starke Anisozytose, Poikilozytose und Cabot'sche Ringbildungen aufweisen, verhalten sich die weißen Blutkörperchen daneben sehr uncharakteristisch. Neben einer Leukozytose und einer mehr oder weniger ausgeprägten Linksverschiebung ergibt sich nichts Besonderes, (was wiederum für die Erkennung der unbekannten Zelle, in diesem Falle des Erythroblasten, sehr günstig wäre, da neben der Zelle x alles andere normal sein soll.)

2. Die chronische reine Erythroblastose des Erwachsenen, (Typ Heilmeyer-Schöner)

Auch hier sind die Erythroblasten vermehrt, so daß auch im peripheren Blut oft mehr kernhaltige Rote als Weiße anzutreffen sind.

3. Echte Erythroleukämien.

Bei dieser sehr seltenen Erkrankung handelt es sich um eine kombinierte Wucherung des erythro- und leukopoetischen Gewebes.

4. Die symptomatischen, (reaktiven) Erythroblastämien.

Hier ist das Auftreten kernhaltiger roter Vorstufen im peripheren Blut nur Begleiterscheinung einer anderen Erkrankung:

a) Verdrängung des Markgewebes durch Metastasen,
b) Leukämien, c) Osteosklerosen.

Die beiden zuletzt genannten Erythroblastosen sind weniger vorteilhaft zur Erkennung und Beschreibung der Erythroblasten, da die Zahl der roten Vorstufen neben der Zahl der weißen Vorstufen zu gering ist.

Der Nachteil dieser 3. Methode liegt auf der Hand. Bei einer Myeloblastenleukämie zum Beispiel mit rund 90% Myeloblasten liegen diese nicht in lehrbuchmäßig schöner Form vor, sondern zeigen Besonderheiten, wie gelappte Kerne, Mikroformen und Auerstäbchen (39). Man spricht deshalb von Paramyeloblasten. Dazu kommt, daß Zellen, die in hohem Maße vermehrt sind, wie zum Beispiel Myeloblasten bei einer Myeloblastenleukämie, Lymphozyten bei einer Lymphadenose und Lymphomonozyten beim Pfeiffer'schen Drüsenfieber währendder Toluidinblaufärbung zu Grunde gehen. Sie zeigen dabei nicht die übliche flächenhafte, gelb-grünliche Doppelbrechung, wie dies defekte und auch künstlich gequetschte Zellen tun, sondern haben - bei normaler Doppelbrechung - ihre Kern-Plasma-Trennung verloren. (Beschreibung siehe unten.) Als Folge davon lassen sich die genannten Zellen, Myeloblasten, Lymphozyten und Lymphomonozyten in ihrer defekten Form nicht absolut sicher voneinander unterscheiden.

a) gut angefärbter Kern

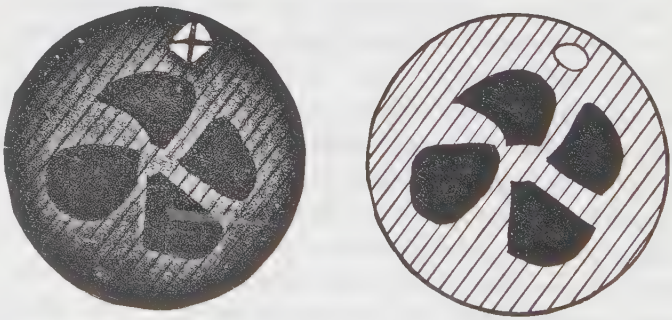
b) nicht angefärbter Kern

c) schwach angefärbter Kern

a) b) c)

---

grosses PK. Vakuole



P nach der Umfärbung

Grundsätzliches zur Toluidinblaufärbung.

Vor der eigentlichen Beschreibung der roten und weißen Vorstufen scheint es mir nötig, noch einiges Grundsätzliches zu der Toluidinblaufärbung zu sagen, insbesondere was Sternalpunktate und Blut von Leukämien betrifft. H a r m s (17) beschreibt die Toluidinblaufärbung als "vorzügliche Zellkernfärbung". Dies trifft zu für das normale periphere Blut. Bei Leukämien ab einer gewissen Zellzahl und im Sternalpunktat haben wir dagegen segment- und stabkernige Leukozyten mit hellem (nicht angefärbtem) Kern und dunklerem Plasma vor uns. Auch die Vorstufen der weißen Reihe haben helle Kerne und dunkles Plasma. Ja, das Plasma bei Myelozyten kann manchmal intensiver (dunkler) angefärbt sein als der Kern eines gut angefärbten Segmentkernigen.
Bei chronischen Myelosen finden wir nun - je nach Akuität des Krankheitsbildes - einen gewissen Prozentsatz der segment- und stabkernigen Leukozyten mit dunklen Kernen, einen weiteren Prozentsatz mit hellen Kernen und einen bestimmten Teil mit ganz schwach gefärbten Kernen vor. Hier kann nun ungünstigerweise die Farbe des Kernes mit der Farbe des Plasmas nahezu identisch sein, so daß die Segmentierung der Zelle nur sehr schwer zu erkennen ist. (Siehe Abb. Seite 12) Liegen mehrere Segmente in einer Zelle vor, so färben sich diese alle gleichmäßig an. Zunächst lag die Vermutung nahe, daß sich bei einer Leukämie wegen der beschleunigten Blutkörperchensenkung die weißen Zellen relativ schnell in einer Schicht ansammeln würden und dadurch dem Farbstoff nicht so ausgesetzt wären. Versuche, bei denen während der einen Stunde Färbezeit alle 5 Minuten das Blut-Farbstoff-Gemisch im Reagenzglas vorsichtig durchmischt wurde, brachten jedoch keine Änderung.
Es wurde auch diskutiert, ob sich diejenigen Zellkerne gut anfärben, deren Zellen bei der Zugabe von Toluidinblau - noch vor dem vorsichtigen Vermischen mit Blut - dem Farbstoff einige Sekunden lang besonders stark ausgesetzt sind. Wäre dies der Fall, dann dürften sich je-

doch z.B. bei Leukämien nicht nur einige Kerne von Segmentkernigen, sondern müßten sich auch einige Myelozytenkerne anfärben.
Durch Verdoppelung und Verdreifachung der Toluidinblaumenge, 0,4 und 0,6 ml Toluidinblau auf ein ml Zitratblut, konnte wohl die Menge der angefärbten Kerne gesteigert werden - allerdings nur bei segment- und stabkernigen Leukozyten, nicht bei den weißen Vorstufen - aber gleichzeitig nahm mit steigender Menge Toluidinblau die Anzahl der defekten Zellen rapide zu, so daß auf diese Möglichkeit verzichtet werden mußte.
Die Erkennung der Segmentkernigen, deren Plasmafarbe etwa der Kernfarbe entspricht, macht auch bei einiger Übung noch Schwierigkeiten, da das Auge bei der Differenzierung der Segmentkernigen auf einen Farbunterschied zwischen Kern und Plasma eingestellt ist. Liegen 2 Segmentkernige nebeneinander, von denen der eine dunkle, der andere helle Segmente hat, so ist nach der Umfärbung des Ausstriches nach Paopenheim kein Unterschied zwischen den beiden Zellen zu sehen.
Die Vermutung scheint gerechtfertigt, daß die Anfärbbarkeit der Kernes mit dem Lebensalter der Zelle zusammenhängt. Die weißen Vorstufen haben fast immer helle Kerne. Bei reifen Formen von chronischen Myelosen mit sehr niedrigem Prozentsatz von Myelozyten können diese angefärbte Kerne haben. Dann sind jedoch auch alle Kerne der Segmentkernigen angefärbt. Je früher die Vorstufe, um so schlechter färbt sich der Kern an.
A r n e t h (2) nahm an, daß die Segmentzahl eine Funktion des Zellalters ist. Er teilte deshalb die "segmentierten" und "unsegmentierten" (35) Formen in Klassen ein, die gleichzeitig Altersklassen entsprechen. Klasse I entspricht dem Stabkernigen, Klasse II dem Segmentkernigen mit 2 Segmenten u.s.w.
R o h r (34) ist dagegen der Auffassung, daß die Segmentzahl keine Funktion des Zellalters ist, sondern anlagemäßig bereits von den unentwickelten Vorstufen aus definiert ist. Je nachdem, von welcher Entwicklungsstufe aus die Zellreifung einsetzt, also ob vom Promyelozyten

oder vom Metamyelozyten aus, entstehen 2 verschieden ge=staltete neutrophile Leukozyten, und zwar bildet sich aus dem Promyelozyten der große stark segmentierte Neu=trophile (mit 5 und mehr Segmenten), aus reifen Myelozy=ten der normal segmentierte (mit 3 und 4 Segmenten) wäh=rend aus dem Metamyelozyten der wenig oder ansegmentierte Leukozyt heranreift. Alle Segmentkernigen machen ein Stadium durch, in welchem erst die Segmentanlagen beste=hen, ohne daß die Kerndurchschnürung schon vollendet wä=re. So ist lediglich der Grad der Kerndurchschneidung eine Altersfunktion.
H e i l m e y e r (19) bestätigte die Auffassung R o h r s. Seit kurzem liegt nun ein experimenteller Be=weis für die Unrichtigkeit der A r n e t h ' schen Theorie vor. (14) Durch Markierung der noch in Teilungs=phase befindlichen Leukozytenvorstufen des Knochenmarks mit radioaktivem Thymidin war es möglich, den Verlauf der Leukozytenausschwemmung in die Peripherie zu beo=bachten.

Es war also zu prüfen, ob die Segmentkernigen, deren Ker=ne intensiver gefärbt waren als das Plasma, überdurch=schnittlich viele Segmente oder aber einen hohen Grad der Kerndurchschneidung aufwiesen.
Zunächst konnte festgestellt werden, daß das Verhältnis der nicht-angefärbten Kerne zu den angefärbten Kernen bei segment- und stabkernigen Leukozyten in demselben Präparat verschieden war. Kamen, z.B. bei einer relativ reifen chronischen Myelose, bei den Segmentkernigen auf 3 helle Kerne ein angefärbter Kern, so wurden bei den Stabkernigen auf 10 helle Kerne ein angefärbter Kern ausgezählt. Im Durchschnitt war die Zahl der hellen Ker=ne bei den Stabkernigen 3 mal so hoch wie bei den Seg=mentkernigen. Das verwunderte nicht, da ja Myelozyten und Metamyelozyten fast immer helle nicht-angefärbte Kerne haben, und angenommen wurde, daß die Anfärbbarkeit des Kernes mit seinem Lebensalter zusammenhängt.
Bei der Prüfung, ob vor allem die stark segmentierten Zellen, nach A r n e t h die älteren Zellen, die ange=

färbten Kerne aufweisen, wurden Zellen mit zwei und mehr Segmenten ausgezählt. Es konnte, im Gegensatz zu den Stabkernigen, nicht festgestellt werden, daß eine Segmentzahl relativ häufiger helle oder dunkle Segmente aufwies als irgend eine andere Segmentzahl. War es noch relativ einfach, die Anzahl der Segmente festzustellen, obwohl die Konturen bei der Toluidinblau-Färbung viel weniger scharf sind als bei der Färbung nach Pappenheim, so wurde es doch recht schwierig, als versucht wurde, den Grad der Kerndurchschneidung zu beurteilen.
Noch eindeutiger als die Beobachtung, daß bei den Segmentkernigen mit angefärbtem Kern die Kerndurchschneidung fortgeschrittener ist, ist die Feststellung, daß die Segmente der angefärbten Kerne weitaus kleiner sind als die Segmente der hellen Kerne. Beides deutet darauf hin, daß die Anfärbbarkeit des Kernes von dem Lebensalter der Zelle abhängt, in dem Sinne, daß die Kerne der älteren Zellen sich leichter anfärben.
Es sei noch einmal darauf hingewiesen, daß ein relativer Farbstoffmangel besteht, wenn sich die Kerne der neutrophilen Granulozyten teilweise nicht anfärben. Die Menge des routinemäßig zugegebenen Toluidinblau reicht nicht aus, um alle Kerne anzufärben, wenn z.B. bei einer Myelose die Zahl der weißen Blutkörperchen auf das 10 fache der Norm angestiegen ist.
Gibt man bei normaler Leukozytenzahl entsprechend weniger Toluidinblau dazu, so färben sich bei diesem absoluten Farbstoffmangel die Kerne der neutrophilen Granulozyten ebenfalls nicht an, während das Plasma relativ gut angefärbt erscheint. Das Ausmaß des relativen Farbstoffmangels und das Zellalter bestimmen also die Zahl der angefärbten Kerne der Segmentkernigen.
Zur Beurteilung der Akuität einer chronischen Myelose wäre nun folgende Methode denkbar: Durch eine Versuchsreihe muß geklärt werden, wieviele nicht-angefärbten Kerne bei einer bestimmten Leukozytenzahl im Durchschnitt zu erwarten sind. Je höher die Leukozytenzahl, desto mehr

nicht-angefärbte Kerne! Der Quotient aus der zu erwar=tenden Anzahl der hellen Kerne zur tatsachlichen Anzahl der hellen Kerne gibt normalerweise 1. Bei Akuität des Krankheitsbildes ist er größer als 1.

Beschreibung der weißen Vorstufen nach Anfärbung mit Toluidinblau.

1. Die Myeloblasten:

Bei Ausstrichen von Paramyeloblastenleukämien und von Sternalpunktaten findet man meistens defekte Blasten vor. Bei chronischen Myelosen dagegen und bei Myeloblasten=leukamien, bei denen die Myeloblasten bei der Färbung nach Pappenheim in lehrbuchmäßig schöner Form vorliegen, sind die Myeloblasten auch bei der Toluidinblau-Färbung erhalten.

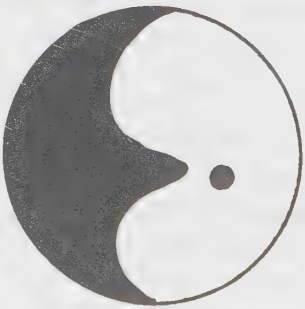
a) Beschreibung der nicht-defekten Myeloblasten:

Sie sind die Zellen, die am wenigsten Farbstoff aufneh=men, und daher so schwach gefärbt, daß sie häufig - ins=besondere zwischen gekreuzten Polars - übersehen werden. Bei der Auszählung ihrer Doppelbrechung wurden sie des=wegen im Hellfeld aufgesucht, und dann erst die Polars gekreuzt, um ihre Doppelbrechung bestimmen zu können. Der typische Myeloblast hat einen ungefähr runden Kern und ist von einem schmalen Plasmasaum umgeben. Der Kern ist ganz schwach getönt; hellgrau bis hellbraun. Der Plasmasaum ist etwas dunkler. Auf den ersten Blick scheinen die Kerne der Myeloblasten überhaupt nicht an=gefärbt zu sein. Beim Vergleich mit Myelozyten und ande=ren Zellen, deren Kern sich nicht anfärbt, bemerkt man jedoch deutlich eine schwache Tönung der Myeloblasten=kerne. Der Plasmasaum scheint manchmal auch zu fehlen, und die ganze Zelle gleichmäßig getönt zu sein; wobei jedoch nach der Umfärbung der Plasmasaum oft klar zu Tage tritt.

Normaler Myeloblast

H+P

Defekter Myeloblast



H

P

Findet man Pseudopodien des Plasmasaumes, so sind diese besonders stark angefärbt.
(Abb. S. 18)

b) Beschreibung der defekten Myeloblasten:

Kern und Plasma sind nicht zu trennen. Die Grundfarbe ist unterschiedlich von Fall zu Fall: dunkel- bis hellgrau-blau. In der Zelle sind dicke, schwarz-blaue Schlieren zu finden, bei deren räumlicher Anordnung man keine Gesetzmäßigkeit entdecken kann. Die Kernmembran scheint zu Grunde gegangen, und Kern und Plasma je nach Zelle mehr oder weniger intensiv miteinander vermischt zu sein. Die stark angefärbten, dicken, schwarz-blauen Schlieren entsprechen dem Plasma. Die restliche, nur schwach angefärbte Substanz entspricht dem Kern. In den schwach angefärbten Zonen liegt ein oder liegen mehrere Nukleoli. Sie haben die intensive Farbe des Plasmas. Während bei den defekten Myeloblasten die Nukleoli auf den ersten Blick ins Auge fallen, sind sie bei den nicht-defekten Myeloblasten nicht so deutlich zu sehen. Hier unterscheidet sich die Farbe der Nukleoli nur unbedeutend von der Farbe des sie umgebenden Kernes.
In der Doppelbrechung unterscheiden sich die defekten Myeloblasten grundlegend von den nicht-defekten. Erstere zeigen vorwiegend die Doppelbrechung der definierten Größe "mittel" und "grob". Dabei liegen keine typischen Polarisationskreuze vor; die Größe der doppelbrechenden Strukturen entspricht jedoch am ehesten jenen Strukturen, in denen ein Polarisationskreuz auftritt.
Die nicht-defekten Myeloblasten weisen folgende Doppelbrechung auf: 1/4 von ihnen zeigt gar keine, ca 3/4 feine und einige wenige Prozent zeigen mittlere Doppelbrechung. Das Kollektiv mit der Doppelbrechung "fein" enthält hierbei einen Prozentsatz Zellen, deren Doppelbrechung man nur nach längerem Spielen mit der Mikrometerschraube entdecken kann.

Unreife leukämische Zellen ("Paraleukoblasten") sind nicht nur Myeloblasten mit einigen Besonderheiten, sie sind biochemisch und ultrastrukturell mit keiner physiologisch vorkommenden Blut- Knochenmark- oder lymphoretikulären Zelle identisch. (6) Die Myeloblasten im Knochenmark entsprechen jedoch am ehesten diesen Paraleukoblasten, obwohl qualitativ von diesen verschieden. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß Paramyeloblasten sowie Myeloblasten aus Knochenmarkspunktaten nach der Färbung mit Toluidinblau in defektem Zustande vorliegen.

Auerstäbchen: Ist die Besetzung eines Paramyeloblasten mit Auerstäbchen so stark, daß die Zelle bei der Färbung nach Papoenheim wie granuliert aussieht, so bietet sie nach der Färbung mit Toluidinblau zwischen gekreuzeten Polars ein den Myelozyten ähnliches Aussehen. Die Zelle zeigt Milchstraßenphänomen. Dies ist die Erscheinung, daß bei feinem Spielen mit der Mikrometerschraube immer wieder neue leuchtende Punkte auf dunklem Grund auftauchen, wodurch sich für diese Art der Doppelbrechung der Vergleich mit einem Sternhimmel anbietet. (Vgl. Beschreibung der Myelozyten.) Eine Differenzierung ist möglich: die Paramyeloblasten zeigen meist keine Kern-Plasma-Trennung und weisen Nukleolen auf.

Differentialdiagnose zu Lymphozyten:

Wie schon oben erwähnt, liegen bei einer lymphatischen Leukämie und beim Pfeiffer'schen Drüsenfieber fast alle Lymphozyten in defektem Zustande vor. Liegt keine Lymphozytose vor, so ist im Durchschnitt nur mit etwa 20% defekter Lymphozyten zu rechnen. Diese defekten Lymphozyten bieten das verkleinerte Abbild der defekten Myeloblasten. Die Lymphozyten sind im ganzen etwas kleiner, heller, die blau-schwarzen Schlieren sind etwas zierlicher und das Plasma erfährt oft am Rande eine gewisse Verdichtung, so daß die Zelle scharfer abgegrenzt erscheint. Von Mikromyeloblasten sind diese defekten Lymphozyten allerdings nicht sicher zu unterscheiden.

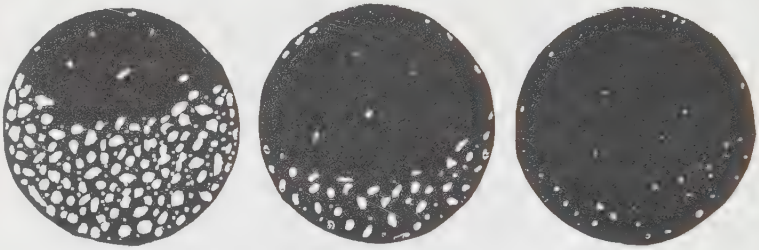
2. Die Promyelozyten und Myelozyten:

Bei der Färbung nach Pappenheim ist der Übergang von Myeloblast zu Promyelozyt genau definiert; die erste Granulierung stempelt die Zelle zum Promyelozyten, auch wenn sie sonst, nach Form und Farbe, noch mehr wie ein Myeloblast imponiert. Diese Differenzierungsmöglichkeit fällt bei der Färbung mit Toluidinblau weg, da ein grosser Teil der Myeloblasten Doppelbrechung, und damit auch im Hellfeld Granula aufweist. Der geringe Prozentsatz der Promyelozyten, die bei der Färbung nach Pappenheim wie Myeloblasten aussehen, jedoch durch das Auftreten einiger weniger Granula zu Promyelozyten werden, wurde deswegen bei der Auszählung der Doppelbrechung zu den Myeloblasten gerechnet.
Das Unterscheidungsmerkmal zwischen Promyelozyten und Myelozyten bei der Färbung nach Pappenheim ist a) die Größe der Zellen, b) die Nukleolen, c) der Reifungsgrad der Granula. Je größer die Zelle und je unreifer die Granula, um so mehr spricht das für einen Promyelozyten. Ist ein Nukleolus sichtbar, so spricht das differentialdiagnostisch wiederum für einen Promyelozyten.

Bei der Färbung mit Toluidinblau ist nur noch die Zellgröße eine Differenzierungsmöglichkeit, da auch die Myelozyten in einem hohen Prozentsatz Nukleolen aufweisen. (Ein ziemlich großer Nukleolus und eine gute Anfärbbarkeit desselben sprechen allerdings wieder für einen Promyelozyten.) Es werden im folgenden nun Promyelozyten und Myelozyten gemeinsam beschrieben, da sie sich nicht so unterscheiden wie bei der Färbung nach Pappenheim.

Der typische Myelozyt (Promyelozyt) ist leicht zu erkennen. Der große, meist exzentrisch gelegene Kern färbt sich nicht an. Das Plasma zeigt den üblichen dunkelblaugrauen Ton in unterschiedlicher Intensität. Die Doppelbrechung findet sich im ganzen Plasmasaum, ist aber an der Stelle, an der sich der Plasmasaum verbreitert,

MYELOCYTEN: 3 Stufen der Doppelbrechung



„dicht 3" „dicht 2" „dicht 1"

BASOPHILER MYELOCYT

H P

besonders deutlich ausgeprägt. Die doppelbrechenden Sub=stanzen liegen in großer Anzahl und in ziemlich gleich=mäßiger Verteilung über das Plasma zerstreut.
Die Doppelbrechung läßt sich in "dicht 1", "dicht 2" und "dicht 3" einteilen. Von der üblichen Art der Einteilung wurde Abstand genommen, und die Polarisationskreuze bei den Myelozyten und Promyelozyten nicht in einer extra Rubrik gezählt, da Polarisationskreuze bei diesen Zellen wohl ab und zu zu finden sind, aber in der Fülle der doppelbrechenden Substanzen vollkommen untergehen. Es schien daher gerechtfertigt, für die Doppelbrechung der Promyelozyten und Myelozyten eine besondere Einteilung anzuwenden.
Unter gekreuzten Polars sind die Myelo- bzw. Promyelo=zyten auf Grund ihrer massiven Doppelbrechung die auf=fallendsten Zellen.

Ad "dicht 1":
Die doppelbrechenden Strukturen sind von der definierten Größe "fein" und "mittel". Bei feinem Spielen mit der Mikrometerschraube tauchen immer wieder neue leuchtende Punkte auf dunklem Grund auf, so daß sich der Vergleich mit einem Sternhimmel anbietet. Diese Art der Doppelbre=chung wurde deshalb "Milchstraßen-Dopoelbrechung" ge=nannt.

Ad "dicht 2":
Neben den doppelbrechenden Strukturen von der Größe "fein" und "mittel" sind noch intensiver doppelbrechende Substanzen zu sehen; außerdem liegen diese dichter. Po=larisationskreuze findet man selten. Man muß nicht mit der Mikrometerschraube spielen, um die Doppelbrechung gut erkennen zu können, diese kann auch bei schnellem Überfliegen des Präparates nicht übersehen werden. Bei der Qualität "dicht 1" steht das dunkle Plasma mehr im Vordergrund. Bei "dicht 2" erscheint die ganze Zelle insgesamt etwas heller, so daß die einzelnen doppelbre=

chenden Strukturen nicht aus dunkler Umgebung heraus aufleuchten. Trotzdem wird die Leuchtkraft der Doppelbrechung hier größer. Die doppelbrechenden Substanzen haben oft nicht die Form von den Granula der neutrophilen Segmentkernigen bei der Färbung nach Pappenheim, sondern sie erscheinen auffallend länglich, was bei "dicht 3" noch ausgeprägter ist. Die Farbe der Doppelbrechung ist in derselben Zelle oft auffallend unterschiedlich; neben dem gelblich-weißen findet man auch einen grünen Ton.

Ad "dicht 3":
Die einzelnen doppelbrechenden Strukturen werden noch grober und liegen dichter. Polarisationskreuze findet man selten. Die länglichen Formen stehen im Vordergrund. (Siehe Abb. S. 22)

Topographische Kern-Plasma-Verhältnisse:

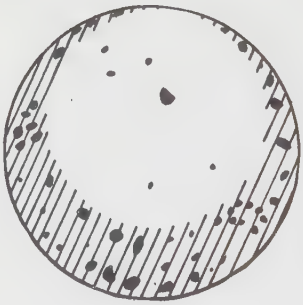
Beim typischen Myelozyten (Promyelozyten) sind die Kern-Plasma-Verhältnisse eindeutig. Der nicht-angefärbte Kern hat die gewohnte Größe und wird von einem Plasmasaum umgeben. Die Farbe des Plasmas ist das gewohnte Dunkelblau, ins Graue übergehend. Bei einem gewissen Prozentsatz der Zellen - unterschiedlich hoch von Fall zu Fall - nimmt jedoch dieses Dunkelblau räumlich fast die ganze Zelle ein. Ein kleiner, nicht-angefärbter Rest am Zellende entspricht dann nur einem Teil des Kernes, denn bei der Umfärbung erscheint der Kern wieder in normaler Größe. Man kann somit - bei der Färbung mit Toluidinblau - bei diesen Zellen die Grenze zwischen Kern und Plasma nicht sicher angeben. Der verbliebene nicht-angefärbte kleine Teil am Rande der Zelle sagt nur aus, daß in dieser Richtung der Kern liegt, jedoch mit viel größerem Volumen.

Erscheint die ganze Zelle angefärbt, und ist auf den ersten Blick auch nicht der Rest eines Kernes zu sehen,

so liegt der Kern in Richtung der abnehmenden Farbinten=sität und der abnehmenden Doppelbrechung. Folgende zwei Tatsachen dienen noch dazu, Kern und Plasma trennen zu können. An der Stelle der intensivsten Doppelbrechung befindet sich immer Plasma. Nuleoli befinden sich immer im Bereich des Kernes. Die Erwähnung dieser Tatsache ist nicht überflüssig, da hier die Nukleoli ja in dem angefärbten Bereich der Zelle liegen, der bei den typi=schen Myelozyten identisch mit dem Plasma ist.

Ohne Zweifel sind bei diesen nicht-typischen Myelozyten die Kerne in einem gewissen Grade defekt. Dennoch wur=den sie nicht als "defekte Myelozyten" bezeichnet, weil sie nämlich nach der Umfärbung ganz normal aussehen. Im Gegensatz dazu sehen die defekten Myeloblasten auch nach der Umfärbung noch wie defekte Myeloblasten aus. Kern und Plasma scheinen miteinander vermischt zu sein, was sich bei der Umfärbung bestätigt. Doch kann bei die=sen Myeloblasten - im Gegensatz zu diesen nicht-typi=schen Myelozyten - auch bei Toluidinblau-Färbung genau gesagt werden, was dem Kern und was dem Plasma angehört.

NEUTROPHILER MYELOCYT



H

P

BASOPHILER MYELOCYT

H

P

Die basophilen Myelozyten.

Während die eosinophilen Myelozyten, wie überhaupt alle Eosinophilen, nur im Hellfeld sicher diagnostiziert werden können, ist für die basophilen Myelozyten die Betrachtung im Hellfeld und zwischen gekreuzten Polars, aber vor allem zwischen gekreuzten Polars zur Diagnose nötig. Die Doppelbrechung der basophilen Myelozyten unterscheidet sich von der Doppelbrechung der neutrophilen Myelozyten insofern, als letztere sternförmig, jede doppelbrechende Struktur alleine stehend, auf dunklem Grunde aufleuchtet, während die doppelbrechenden Strukturen der basophilen Myelozyten so dicht beieinander liegen, daß sie sich zu berühren scheinen. (Siehe Abb. S. 26) Dies ist nicht verwunderlich, da ja die basophilen Granula, die - im Gegensatz zu den eosinophilen und neutrophilen Granula - die Doppelbrechung in basophilen Zellen verursachen (30), recht groß sind und dicht beieinander liegen.

Als weiteres Unterscheidungsmerkmal zu neutrophilen Myelozyten kann die Anordnung der doppelbrechenden Granula innerhalb der Zelle herangezogen werden. Man kann bei den basophilen Vorstufen eine Kreuz-, eine Stern-, eine Semmel- und eine Kreis-Form unterscheiden. (Siehe Abb. S. 28) T h o n n a r d - N e u m a n n (42) beschreibt die "Ring-Form" als "juvenile", die "Stern"- und "Semmel-Form" als "intermediate" im Gegensatz zu dem "mature cell type", dessen Granula gleichmäßig über die Zelle verteilt sind.

Steht nun bei einer Zelle zur Differentialdiagnose: neutrophiler oder basophiler Myelozyt und findet sich eine der beschriebenen Anordnungen der doppelbrechenden Strukturen, so spricht das für einen basophilen Myelozyten.

A r n o l d (3) konnte bei Basophilen des peripheren Blutes keine Beziehung zwischen der Art der Granulierung und dem Alter der Zelle finden.

BASOPHILE DOPPELBRECHUNG
(4 FORMEN)

KREUZ–

STERN–

SEMMEL–

KREIS–FORM

Es gibt noch eine Sonderform des basophilen Myelozyten, die nur bei einem Patienten, bei einer Blutentnahme gefunden wurde. (Siehe Abb. S. 22) Ihr Vorkommen in Ausstrichen war äußerst selten. Es handelt sich bei dieser Form entweder um junge basophile Myelozyten oder aber um basophile Promyelozyten. Die Zelle ist groß. Sie zeigt Doppelbrechung in Form einer größeren Anzahl (5 - 10) untadeliger, nicht verzerrter, aber relativ kleiner Polarisationskreuze. Über den Kern kann nicht viel ausgesagt werden, was bei den Basophilen die Regel ist, da die Granula oft den Kern verdecken. (42)
Ob man bei Promyelozyten basophile, neutrophile und eosinophile Formen unterscheiden kann, ist eine Ansichtssache. T h o n n a r d - N e u m a n n beschreibt den Promyelozyten als den ersten identifizierbaren Basophilen. U n d r i t z und R o t h l i n teilen sogar den Myeloblasten in basophile, neutrophile und eosinophile Formen ein. (44)

Zur Frage des Heparingehaltes der basophilen Granula.

Diese Frage wurde zuerst bei den basophilen Granula der Gewebsmastzellen geklärt. J o r p e s (22) sah schon seit einiger Zeit die Granula der Gewebsmastzellen als Reservoir des Heparins an, nachdem H o l m g r e n und W i l a n d e r (21) schon 1937 in ihnen Heparin nachgewiesen hatten.
In menschlichen Blutmastzellen ist Heparin zuerst von R o k a und M a r t i n beschrieben worden (27, 16), nachdem T h o m a und W i e r c i n s k i (41) auf Grund von Tierversuchen schon früher vermutet hatten, daß die Granula der basophilen Leukozyten einen die Blutgerinnung hemmenden Stoff vom Typ des Heparins enthalten.
A m a n n (1) konnte diese Befunde bestätigen.

Das in den Granula lokalisierte Heparin bedingt die Metachromasie der Blutbasophilen. (10) In unreifen Zellen liegen zum Teil Heparinvorstufen als Heparin - Monoschwefelsäureester vor. Mit fortschreitender Sulfurierung nimmt die Metachromasie zu. (9)
Hier liegt die Erklärung, warum die basophilen Vorstufen nicht einfach durch ihre Metachromasie von den entsprechenden neutrophilen Vorstufen unterschieden werden können. Sie ist zu gering ausgeprägt. So gelten zur Unterscheidung hauptsächlich die oben angeführten Gesichtspunkte, insbesondere, wenn Blut von myeloischen Leukämien benutzt wird, wo viele Basophile gefunden werden und deren Granula weniger heparinreich sind. (9)

M i s s m a h l (30) beschreibt die basophilen Granula als ellipsoide Körper. Er stützt sich dabei auf die Tatsache, daß die Polarisationskreuze in den basophilen Granula in der Regel verzerrt erscheinen.
Da nun in sehr jungen basophilen Myelozyten eine große Anzahl nicht-verzerrter Polarisationskreuze gefunden wurde, ist zu vermuten, daß die basophilen Granula zunächst rund und mit zunehmendem Alter (= zunehmender Sulfurierung) jedoch elliptisch werden.
Dem entspricht die Beobachtung, daß man bei reifen Basophilen in seltenen Fällen noch nicht-verzerrte Polarisationskreuze findet, die demnach noch nicht genügend SO_4-Gruppen eingelagert haben.

Die Jugendlichen.

Jugendliche zeigen in ihrer Morphologie nichts Überraschendes. Sie sind kleiner als die Myelozyten und weisen vor allem eine viel schwächere Doppelbrechung auf. Das übliche Einteilungsschema fein - mittel - grob - grob mehr als 3' konnte verwendet werden. Der Kern ist mehrheitlich nicht angefärbt. In seltenen Fällen findet man jedoch auch bei dieser Zellart Kerne, die stärker angefärbt sind als das Protoplasma. Insgesamt ist diese Zelle am wenigsten interessant. Myeloblasten zeichnen sich durch Nukleolen, Promyelo- und Myelozyten durch eine starke, gleichmäßige Doppelbrechung, die Stabkernigen durch eine unterschiedliche Doppelbrechung mit relativ vielen Polarisationskreuzen und die Segmentkernigen zeichnen sich durch eine Vielgestaltigkeit des Kernes aus.
Einem Jugendlichen fehlt jede Besonderheit.

Beschreibung der roten Vorstufen nach Anfärbung mit Toluidinblau.

1. Die Retikulozyten:

Retikulozyten lassen sich durch Supravitalfärbung, also auch durch die Färbung mit Toluidinblau darstellen. Durch ihre substantia granulo-filamentosa kann man sie von reifen Erythrozyten unterscheiden. Der Kern der Normoblasten sieht bei der Toluidinblau-Färbung nicht so kompakt aus wie bei der Färbung nach Pappenheim. Die Retikulozyten werden mit H e i l m e y e r (18) in 4 Stufen eingeteilt. Die Nr. 1, die Knäuelform, kann, besonders wenn die substantia granulo-filamentosa dicht gelagert ist, mit Normoblasten verwechselt werden. Dies ist bei hämolytischen Anämien mit hoher Retikulozytenzahl der Fall. Retikulozyten zeigen Doppelbrechung. Im Hellfeld sind die schwarzen Punkte, die zwischen gekreuzten Polars doppelbrechen, immer gut von der substantia granulo-filamentosa zu unterscheiden, die sich als netzförmig angeordnete, kleinere schwarze Punkte darstellt.

Die Einteilung der roten Vorstufen ist von Autor zu Autor recht unterschiedlich. B o c k (5), dessen Einteilung hier übernommen wurde, sieht den Hb-Gehalt der roten Blutzellen für das entscheidende Kriterium des Ausreifungsgrades der roten Blutzellvorstufen an. Ob die Zellen dabei Makroformen, normalgroße oder Mikroformen darstellen ist nicht so entscheidend. Je nach dem Kernbau unterscheidet man in der hämoglobinfreien, im engeren Sinne erythroblastisch genannten basophilen Gruppe als auch in der hämoglobinhaltigen, im engeren Sinne normoblastisch genannten Untergruppe junge, gewöhnliche und alte Formen. Die jungen Formen sind fast immer größer als die älteren; am meisten ist jedoch darauf zu achten, ob die Kerne locker (=jung) oder pyknotisch (=alt) sind. Die polychromatischen roten Vor-

stufen gehören meist zu den jungen Normoblasten. Diese Unterschiede in den Kernen der roten Vorstufen bei der Färbung nach Pappenheim kommen bei der Toluidinblau-Färbung nicht so zum Vorschein. Es wurde deshalb nur zwischen Erythroblasten und Normoblasten unterschieden. Die Unterscheidung in jung - gewöhnlich - alt innerhalb dieser Gruppen konnte nicht durchgeführt werden.

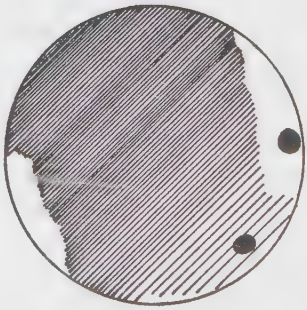
2. Die Normoblasten:

Vgl. Abb. S. 34! Es ist in schematischer Weise ein Normoblast zwischen zwei Erythrozyten dargestellt. Man kann erkennen, daß der Kern dunkler ist als das Plasma. Das Plasma entspricht in der Farbe ungefähr den daneben-liegenden Erythrozyten. Oft ist das Plasma jedoch so schwach angefärbt, daß es ohne die darin enthaltenen doppelbrechenden Strukturen übersehen werden würde. (Die Doppelbrechung in der Abbildung konnte aus technischen Gründen leider nicht mit weißer Tusche dargestellt werden, da sich auf einem grauen Papier bei der photomechanischen Verfielfältigung wiederum der schwarze Kern nicht darstellen würde.)

Sind in einem Präparat nur wenig Normoblasten enthalten, und ist deren Doppelbrechung gering, so werden sie in der Regel mit Lymphozyten verwechselt, wenn diese nicht bezüglich ihrer differentialdiagnostischen Unterschiede zu Normoblasten genau betrachtet werden. Der Kern der Lymphozyten ist in der Regel größer als der Kern der Normoblasten. Ein Plasmasaum ist bei Lymphozyten meistens nicht zu sehen, wenn doch, dann ist er außerordentlich schmal. Bei Normoblasten dagegen ist meist ein deutlicher Plasmasaum zu erkennen. Bei einer hämolytischen Anämie mit Normoblasten im Blut zeigen diese eine starke Doppelbrechung. In solchem Falle ist die Doppelbrechung das einfachste Kriterium zur Unterscheidung von Lymphozyten und Monozyten.

NORMOBLAST ERYTHROBLAST

MEGALOBLAST



3. Die Erythroblasten:

Vgl. Abb. S. 34! Es ist ein Erythroblast zwischen zwei Erythrozyten dargestellt. Man sieht, daß das Plasma intensiver angefärbt ist als der Kern. Dies entspricht den weißen Vorstufen, bei denen sich die Kerne der jungen Zellen nicht so gut anfärben wie die Kerne der älteren Zellen, bzw. das Plasma stärker angefärbt ist als der Kern. Bei der Färbung mit Toluidinblau erscheint der Kern der Normoblasten dunkel bis schwarz, während der Erythroblastenkern grünlich-grau erscheint. Doppelbrechende Strukturen sind in den Erythroblasten zu finden, öfters mit einem rötlichen Farbton, insgesamt ist jedoch die Doppelbrechung bei den Normoblasten stärker ausgeprägt als bei den Erythroblasten.

Beschrieben wurden hier Erythroblasten mit dem Reifungsgrad "gewöhnlich" bis "alt". Junge Erythroblasten scheinen während der Färbung zu Grunde zu gehen. Kern und Plasma sind dann nicht mehr zu trennen. Die Unterscheidung zu defekten Myeloblasten und zu anderen defekten Zellen ist nicht mehr mit Sicherheit möglich.

4. Die Megaloblasten:

Megaloblasten sind in Ausstrichen nur in defektem Zustande zu finden. Siehe Abb. S. 34! Man kann sie von defekten Myeloblasten nicht unterscheiden. Die Abbildung auf Seite 18 "defekter Myeloblast" entspricht genau der Abbildung auf Seite 34 "Megaloblast". Beim defekten Myeloblasten wurde das Plasma schwarz dargestellt, um doppelbrechende Strukturen einzeichnen zu können. Beim Megaloblasten wurde das Plasma schraffiert gezeichnet, um zu zeigen, daß die Farbintensität des Plasmas dem Kerne zu abnimmt. Die Doppelbrechung der Megaloblasten entspricht der Doppelbrechung der defekten Myeloblasten.

Die Doppelbrechung bei den roten Vorstufen:

Die Doppelbrechung ist bei den roten Vorstufen unterschiedlicher als bei den weißen Vorstufen. So findet man in einem Präparat Normoblasten ohne Doppelbrechung neben Normoblasten mit Doppelbrechung der definierten Größe "grob mehr als 3". Insbesondere wurden bei einer Thalassämia major ein außerordentlich hoher Doppelbrechungsindex gefunden. Die Stärke der Doppelbrechung bei der Supravitalfärbung mit Toluidinblau geht parallel mit dem Ausmaß der basophilen Tüpfelung bei der Färbung nach Pappenheim.

N a e g e l i (32) beschreibt eine ring- oder reihenförmige Anordnung der basophilen Körper um Normoblastenkerne. Diese Ringkörper, nur angedeutet oder ganz ausgebildet, waren in den Normoblasten häufig zu finden. Zwischen gekreuzten Polars war dieser doppelbrechende Ring das einfachste Unterscheidungsmerkmal zu Lymphozyten, die ja nie eine besonders starke Doppelbrechung aufweisen.

Nach R o h r (36) ist diese pathologische basophile Punktierung bei toxischen Erythropoesestörungen, bei toxischen Anämien, bei gewissen hereditären und erworbenen hämolytischen Anämien und bei leukämischen Blutbildern nachweisbar. Am ausgeprägtesten wurde sie bei unseren Untersuchungen bei zwei Fällen von Thalassämia major gefunden.

Die Vermutung liegt nahe, daß bei gesteigerter Erythropoese die in großer Anzahl in Normoblasten gefundenen doppelbrechenden Strukturen etwas mit der Verdauung des eigenen abzubauenden Kernes zu tun haben. Es handelt sich bei diesen doppelbrechenden Körpern mehrheitlich um Strukturen der definierten Größe "grob".

L e m k e (25) konnte nachweisen, daß es sich bei diesen groben Strukturen in peripheren Blutzellen um Zytolysosomen handelt.

Lysosomen:

Der Begriff "Lysosomen" wurde 1955 von de D u v e (13) geprägt. Er verstand darunter Zellorganellen, die einen Teil des intrazellulären Verdauungsapparates darstellen. Sie sind besonders häufig in Leber, Niere, Milz und in den Leukozyten. Sie haben folgende Eigenschaften.

1. Eine Größe zwischen 0,2 und 0,6μ.
2. Einen hohen Gehalt an leicht löslichen hydrolytischen Enzymen mit einem Wirkungsoptimum im sauren Bereich.
3. Das Fehlen eines oxydativen Stoffwechsels.
4. Die Umscheidung mit einer Lipoproteidmembran.
5. Bestimmte Möglichkeiten, diese Membran zu zerstören und damit die Enzyme freizusetzen.

1956 wurden diese Organellen von N o v i k o f f (33) elektronenoptisch durch Anfärbung der sauren Phosphatasen nachgewiesen. Die Organellen haben eine sehr unterschiedliche Größe von 0,2 - 0,6μ mit verwirrender Polymorphie. Sie haben im elektronenoptischen Bild eine dreischichtige Membran, sind rund bis oval, auch bizarre Formen kommen vor. Von fast leeren Säckchen bis zu elektronendichten Körpern bestehen alle Übergänge. Häufig finden sich geschichtete Lamellensysteme, sogenannte Myelinfiguren oder Restkörper. Die Lamellen füllen einen Körper ganz oder teilweise aus. Sie werden als Endprodukte der Phagozytose aufgefaßt. (28) Eine enge Verwandtschaft wird zwischen dem Golgiapparat und den Lysosomen angenommen. (33) Die Lysosomen spielen eine Rolle bei der Phagozytose, Zellabwehr und Zellverdauung.

Man unterscheidet a) Lysosomen, die nur hydrolytische Fermente und noch keine abzubauenden Substanzen enthalten, sogenannte primäre Lysosomen. b) Lysosomen, die bei der Verarbeitung von phagozytiertem Material gebildet werden. c) Sogenannte Residual- oder Restkörper, die entstehen, wenn Substanzen durch die hydrolytischen Fermente nicht ganz abgebaut werden können.

d) Eine Gruppe von Einschlüssen, deren Beziehungen zu den Lysosomen noch unklar sind. Hierzu gehören die Granula in sezernierenden Zellen, die "multivesiculated bodies" und die "microbodies" und schließlich - in diesem Zusammenhang besonders interessant - e) Lysosomen, die aus umschriebenen Autolysezonen innerhalb einer Zelle entstehen. Diese Bezirke werden von einer Membran umgeben und entwickeln sich ebenfalls zu typischen Lysosomen. Abhängig von der Lokalisation in der Zelle können die Reste vieler Zellbestandteile in einem solchen Einschluß nachgewiesen werden. Diese Lysosomenart wird als Zytolysosomen bezeichnet. (28)

K r i s c h (24) schreibt folgendes über die Autolyse-Funktion der Lysosomen: Nach de Duve enthält die Zelle in den Lysosomen potentielle "suicide bags", die nur wegen der Substratundurchlässigkeit der Lysosomenmembran normalerweise nicht zur enzymatischen Selbstauflösung der Zelle führen. Wahrscheinlich spielen die lysosomalen Hydrolasen, nachdem sie einmal durch die Verschiebung des intrazellulären pH-Wertes nach dem Sauren aktiviert worden sind, eine wichtige Rolle bei der abakteriellen postmortalen Autolyse.

Wie auf vielen anderen Gebieten, so hat es sich auch hier gezeigt, daß durch die Einführung des Lysosomenkonzepts viele interessante Einblicke in das biologische Geschehen erzielt werden konnten.

Sind die groben Strukturen in den Normoblasten mit den Zytolysosomen identisch, so ist verständlich, warum die Doppelbrechung bei den Normoblasten so unterschiedlich ausfällt. Je gesteigerter die Erythropoese ist, das heißt je schneller die Kerne der Normoblasten abgebaut werden, um so mehr Zytolysosomen werden vorliegen, und um so höher wird der Doppelbrechungsindex sein.

Diskussion der Ergebnisse:

Das Blut, das zur Herstellung der Präparate zur Verfü=gung stand, stammt vorwiegend von Patienten mit Leukä=mien. Da in den Ausstrichen häufig defekte Zellen vorka=men, ja manche Zellarten, wie zum Beispiel die Paramye=loblasten, nur in defektem Zustande vorlagen, muß dis=kutiert werden, ob die Zellen bei Leukämien vermindert resistenzfähig sind.

Während bei Gesunden die normale mechanische Leukozyten=resistenz praktisch konstante Werte aufweist, (40) fan=den L u s v a r g h i u. a. (26) bei Leukämien gewisse Veränderungen. Und zwar ist die mechanische Resistenz reifer leukämischer Zellen bei myeloischen Formen nor=mal und bei lymphatischen Formen erhöht. Unreife myelo=ische Zellen sind resistenter und unreife lymphatische Zellen sind weniger resistent als normal. Hämozytobla=stäre, monoblastäre und retikulohistiozytäre Zellen scheinen gegenüber mechanischen Schädigungen weniger resistent zu sein als Lymphozyten, Monozyten und poly=morphkernige Granulozyten.

Von diesen Befunden konnte vor allem bestätigt werden, daß unreife myeloische Zellen resistenter und hämozyto=blastäre Zellen weniger resistent gegenüber mechanischen Schädigungen sind als normal.

B r ü s c h k e und Mitarbeiter (11) fanden einen An=stieg der osmotischen Leukozytenresistenz mit dem Alter. Dies konnte jedoch bei dem vorliegenden Patientengut vernachlässigt werden. Daß bei Leukämien gewisse Zellen weniger resistent sind als normal, ist wohl zu berück=sichtigen, doch spielt wohl eine ebenso große Rolle, daß die Supravitalfärbung mit Toluidinblau für Zellen jeder Art eine erhebliche Belastung darstellt.

Ein weiterer zu berücksichtigender Gesichtspunkt ist der, daß die Patienten mit Leukämien mit Zytostatika behandelt wurden. Daß die Gabe von Zytostatika "zwangs=weise eine leukozytensenkende Maßnahme" (7) darstellt,

ist schon länger bekannt. In den letzten Jahren wurden jedoch auch qualitative Veränderungen an den weißen Blutzellen beschrieben. D u s t i n (12) nennt die einzelnen Blutzellarten beim Kaninchen bezüglich ihrer Sensibilität in folgender Reihenfolge: Lymphozyten, Granulozyten, Erythroblasten und Thrombozyten.
B o v e r (8) betont, daß eine Stunde nach Einspritzung von stickstoffhaltigen Seifen (ebenfalls Kaninchenversuch) wohl qualitative, aber keine bemerkenswerten quantitativen Veränderungen zu verzeichnen gewesen wären. So zeigten vor allem die meisten Neutrophilen degenerative Läsionen. Die lytische Wirkung der stickstoffhaltigen Seifen auf die Kerne der granulozytischen Reihe war auffälliger in den unreifen, aber bereits differenzierten Formen. Man sah diese Karyorhexis häufiger in den Promyelozyten und Myelozyten als in den Segmentierten.
Z a c h (45) fand unter Einwirkung von Thio-Tepa im Tierversuch eine generelle Größenzunahme der neutrophilen Granulozyten, Riesengranulozyten (doppelte Größe), eine Dissoziation der Kern- und Protoplasmareifung, eine toxische Granulierung, eine Kern- und Protoplasmavakuolisierung und eine Vergröberung der Granula. Im Mark konnte er Riesenmyelozyten iund Riesenpromyelozyten beobachten.
Diese beobachteten qualitativen Veränderungen des Blutbildes beruhen auf Tierversuchen, wo massive Dosen von Zytostatika gegeben werden konnten. Es ist nicht zu erwarten, daß beim Menschen die qualitativen Veränderungen des Blutbildes auch so ausgeprägt sind wie in den Tierversuchen, doch muß mit gewissen Veränderungen jedenfalls gerechnet werden.
Bei allen Präparaten von Patienten mit Leukämien wurde deshalb zuerst in den nach Pappenheim gefärbten Ausstrichen nach diesbezüglichen Veränderungen gesucht. Doch konnte nie eine Veränderung solchen Ausmaßes, daß sie hätte berücksichtigt werden müssen, festgestellt werden.

M i s s m a h l und R o l l (31) fanden bei 233 Fällen von histologisch oder röntgenologisch gesicherten malig= nen Tumoren in ca. 28% Tumorzellen im strömenden Blut. Dabei wurden durch Sedimentation und Zentrifugation die Tumorzellen angereichert.
So wurde bei Betrachtung und Auszählung der beschriebenen Zellen auch damit gerechnet, daß sich eine Tumorzelle im Ausstrich befinden könnte, da ja auch Blut von Patienten mit malignen Tumoren untersucht wurde. Tumorzellen sind leicht mit Vorstufen aus der weißen und roten Reihe zu verwechseln. (31) Es wurde jedoch nie eine Zelle gefun= den, die mit Sicherheit als Tumorzelle hätte bezeichnet werden können.

Besprechung der Tafel I. (S.42) Übersicht der Dop= pelbrechung der beschriebenen Zellen.

Zur Errechnung von einem Doppelbrechungsindex (DI) bei den Myelozyten und Promyelozyten, die ja nicht in der üblichen Weise in "fein - mittel - grob - grob mehr als 3", sondern in "dicht 1", "dicht 2" und "dicht 3" eingeteilt worden waren, wurde "dicht 1" dem Wert "mittel", "dicht 2" dem Wert "grob" und "dicht 3" dem Wert "grob mehr als 3" gleichgesetzt. Entsprechend wurde "dicht 1" mit 2, "dicht 2" mit 3 und "dicht 3" mit 4 multipliziert, um einen DI. zu erhalten, der mit dem der Segmentkernigen zu vergleichen war.
Bei der Übersicht fällt zunächst auf, daß nur 2 Zellar= ten, nämlich die Normoblasten und die Myeloblasten, in einem gewissen Prozentsatz keine Doppelbrechung aufwei= sen. Bei den Myeloblasten ist durch den großen Unter= schied in der Doppelbrechung zwischen nicht-defekten und defekten Myeloblasten auch die Differenz zwischen nied= rigstem DI. (0,8) und größtem DI. (2,07) größer als bei allen anderen Zellen. Der kleinste niedrigste DI. ist

	keine DB. %	fein %	mittel bzw. dicht 1 %	grob bzw. dicht 2 %	grob 3 bzw. dicht 3 %	Anzahl der Fälle	DI. (m)	DI. (n)	DI. (gr)
Myeloblasten:	4,3	51,9	35,9	7,9	Ø	15	1,47	0,8	2,07
Promyelozyten:	Ø	Ø	23,9	66,4	9,7	7	2,85	2,76	3,52
Myelozyten:	Ø	Ø	34	60,5	5,5	16	2,71	2,41	2,97
Jugendliche:	Ø	76,3	18,9	4,8	Ø	12	1,28	1,17	1,54
Normoblasten:	11,8	35,8	36,7	14,2	1,5	6	1,57	1,39	1,85

DI. (m) = mittlerer Doppelbrechungsindex
DI. (n) = niedrigster Doppelbrechungsindex
DI. (gr) = größter Doppelbrechungsindex

bei den Myeloblasten, der kleinste mittlere DI. bei den Jugendlichen zu finden. Die Jugendlichen weisen die geringste Differenz zwischen niedrigstem und größtem DI. auf, sie haben den kleinsten mittleren DI. und sind somit bezüglich der Doppelbrechung die farbloseste Zellgruppe.
Bei den Normoblasten schwankt der DI. von Präparat zu Präparat nur wenig, dagegen ist bei ein und demselben Präparat die Doppelbrechung von Zelle zu Zelle recht unterschiedlich, da immerhin 11,8% der Zellen gar keine und 1,5% der Zellen die Doppelbrechung der Größe "grob mehr als 3" aufweisen, während es sonst überhaupt gar keine Zellart gibt, bei der zur Einteilung der Doppelbrechung die beiden extremen Werte "keine Doppelbrechung" und "grob mehr als 3" beide benötigt werden.

Die Erythroblasten fehlen in der Doppelbrechungs-Übersicht. Es waren insgesamt zu wenig Präparate vorhanden, in denen Erythroblasten vorkamen, als daß über deren Doppelbrechung etwas Signifikantes hätte ausgesagt werden können. In den Ausstrichen von Knochenmarkspunktaten liegen sie in defektem Zustande vor und können von anderen defekten Zellen nicht unterschieden werden.
10 mal wurden Präparate angefertigt vom ersten Blut einer Austauschtransfusion bei Rh-Inkompatibilität bei Neugeborenen. Davon wurden nur in zwei Fällen rote Vorstufen im Ausstrich gefunden. Und nur einmal waren auch einige Prozent Erythroblasten zu finden. So steht überhaupt alles über die Erythroblasten Ausgesagte auf einer schmaleren Basis als bei den anderen Zellen.

Ein Vergleich in der Doppelbrechung zwischen Blut von Leukämien und Sternalpunktaten sagt wegen der geringen Zahl der Fälle nur wenig aus. Der mittlere DI. liegt bei Ausstrichen von Sternalpunktaten etwas höher als der mittlere DI. bei Ausstrichen von Leukämie-Blut. Das gilt für alle Zellen.

Zusammenfassung:

Es wurde untersucht, ob die von M i s s m a h l (29) beschriebene Doppelbrechung im Protoplasma supravital mit Toluidinblau gefärbter Leukozyten des peripheren menschlichen Blutes auch bei den Vorstufen der roten und weißen Blutzellen zu finden war.
Es wurden Ausstriche von peripherem menschlichen Blut, wenn darin rote und weiße Vorstufen enthalten waren, und von Sternalpunktaten hergestellt, nachdem die Zellen vorher in üblicher Weise supravital mit Toluidinblau gefärbt worden waren. So kam Blut von Patienten mit folgenden Krankheitsbildern zur Untersuchung:
akute Myeloblastenleukämie, chronische Myelose, Thalassämia major und Erythroblastose neonatorum bei Rh-Inkompatibilität.
Zunächst mußte festgestellt werden, daß sich - im Gegensatz zu normalem peripherem Blut - in Ausstrichen von Sternalpunktaten und von Leukämieblut die Kerne vieler Segmentkernigen nicht anfärben. Dies wurde auf einen relativen Farbstoffmangel bei hoher Leukozytenzahl und auf eine schlechtere Anfärbbarkeit des Kernes bei jugendlicher Zelle zurückgeführt.
Um die, in ihrer Morphologie der doppelbrechenden Strukturen noch nicht beschriebenen, roten und weißen Vorstufen identifizieren zu können, wurden drei Methoden benutzt, die ausführlich beschrieben sind. Es zeigte sich, daß während der Färbung mit Toluidinblau einige Zellarten bevorzugt zu Grunde gehen. In manchen Fällen kann jedoch auch noch bei defekten Zellen die Zugehörigkeit zu dieser oder jener Zellart bestimmt werden. Paramyeloblasten im Blut, Myeloblasten, Megaloblasten und Erythroblasten im Knochenmark liegen meist in defektem Zustande vor.
Doppelbrechung konnte in allen Zellen nachgewiesen werden. Bei nicht-defekten Myeloblasten und bei Normobla-

sten wurde ein bestimmter Prozentsatz Zellen gefunden, bei denen keine doppelbrechenden Strukturen zu sehen waren.
Die stärkste Doppelbrechung wurde bei den Promyelozyten und bei den Myelozyten gefunden. Sie fällt bei den Jugendlichen stark ab, um bei den Stabkernigen wieder anzusteigen.
Die basophilen Myelozyten zeichnen sich aus durch eine spezifische Anordnung der Granula. Die Doppelbrechung der Granula ist von ihrem Heparingehalt abhängig.
Bei den defekten Myeloblasten scheinen Protoplasma und Kern vermischt zu sein. Die Doppelbrechung in diesen defekten Zellen ist stärker, als der betreffenden Zellart zustünde.
Bei der Besprechung der roten Vorstufen wurde auf das Lysosomenkonzept eingegangen, womit eine starke Zunahme der Doppelbrechung in Normoblasten bei hämolytischen Anämien erklärt werden konnte.

Literatur:

1. AMANN, R.; H. MARTIN: Blutmastzellen und Heparin, Acta haemat. 25, S. 209-219, (1961)

2. ARNETH, J.: Qualitative Blutlehre und Blutkrankheiten, 2. Aufl. J.A.Barth Verlag, Leipzig, S. 12-15, (1945)

3. ARNOLD, S.: Quantitative und qualitative Untersuchungen an basophilen Leukozyten im polarisierten Licht, Dissertation Tübingen, (1965)

4. BETKE, K.: Lehrbuch der Kinderheilkunde, herausgeg. von W.Keller und A. Wisskott, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Aufl. S. 610 (1966)

5. BOCK, H.E.: Das Hämomyelogramm. Klinische Wochenschrift, 18. Jahrg. Nr. 50, S. 1565 (1939)

6. BOCK, H.E.; R. GROSS: Erkrankungen der Leukopoese und des Retikulo-Histiozytären Systems. Klinik der Gegenwart, Band 10, S. 580, (1962)

7. BOCK, H.E.: Die Durchführung von Zytostatikakuren. Wiener klinische Wochenschr. 78. Jahrg. Nr. 31/32, S. 541-548 (1966)

8. BOVER, G. FORTEZA; R. BAGUENA CANDELA; F. MARCO ORTS; W. CALVO GARRA: Wirkung wiederholter massiver Dosen von Nitrogen-Mustard (Me=

thyl-bis-beta-Chloräthylamin) auf Blutbild und hämopoetische Organe des Kaninchens. Acta hämat. 3 S. 323 (1950)

9. BRAUNSTEINER, H.: Strukturprobleme der Leukozyten. Wiener Zeitschrift für Innere Med. 44 S. 11-16 (1963)

10. BRAUNSTEINER, H.: Funktion der Leukozyten. Der Internist 3, S. 89-95 (1962)

11. BRÜSCHKE, G.; H. HERRMANN; F.H. SCHULZ: Altersabhängige Veränderungen in weissen Blutzellen. Med. Welt 46 S. 2460-2464 (1960)

12. DUSTIN, P.: Die zytostatischen Substanzen und ihre Wirkung auf die Hämopoese. Handbuch der gesamten Hämatologie, herausgeg. von L. Heilmeyer u. A. Hittmair, 3. Band, 1. Teil, S. 27 (1960)

13. DE DUVE, C.: The Lysosome concept. Lysosomes, J.A. Churchill, London, S. 1-31 (1963)

14. FLIEDNER, T.M.; E.R. CRONKITE: Reifung, Lebenserwartung und Schicksal neutrophiler Granulozyten. Med. Welt 10, S. 466-472 (1964)

15. GAMPE, G.: Zur Entstehung doppelbrechender Strukturen in Leukozyten. Dissertation, Tübingen (1966)

16. GUNDERMANN, K.-O.:
Basophile Granulozyten, neuere Erkenntnisse über Zusammensetzung und Funktion des Blutes. DMW 87, S. 506-509 (1962 / 1)

17. HARMS, H.: Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie, Teil 2. Staufen Verlag Kamp-Lintfort, S. 230 (1965)

18. HEILMEYER, L.; H. BEGEMANN:
Atlas der klinischen Hämatologie und Zytologie, Bildband. Springer Verlag Berlin, Göttingen. (1955)

19. HEILMEYER, L.: Sitzungsbericht über die Gründung und erste Tagung der Schweiz. hämatolog. Gesellschaft. Med. Klinik 42 S. 120-121 (1947)

20. HEILMEYER, L.; H. BEGEMANN:
Handbuch der Inneren Medizin, Band 2, begründet von L. Mohr und R. Staelin, 4. Auflage, S. 420-428 (1951)

21. HOLMGREN, H.; O. WILANDER:
Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion der Ehrlich'schen Mastzellen. Zeitschr. für mikroskop.-anat. Forschung 42, S. 279-301 (1937)

22. JORPES ET AL.: Über das Vorkommen von Heparin in den Gefäßwänden und in den Augen. Zeitschr. für mikroskop.-anat. Forschung 42, S. 242-277 (1937)

23. KLEIHAUER, E.: Zur Struktur der fetalen Erythrozyten. Wiener Zeitschr. für Innere Medizin 44, S. 17-20 (1963)

24. KRISCH, K.: Lysosomen. DMW 91, S. 1274-1280 (1966)

25. LEMKE, R.: Die Wirkung von Vinblastinsulfat (Velbe^{R}) und Cyclophosphamid (Endoxan^{R}) auf die Doppelbrechung neutrophiler Granulozyten nach Supravitalfärbung mit Toluidinblau. Dissertation, Tübingen (1967)

26. LUSVARGHI, E.; L. BELLESIA; P. MUCCI: The Mechanical Resistance of White Blood Cells in Leukaemia. Acta haemat. 22, S. 333-344 (1959)

27. MARTIN, H.; L. ROKA: Zur Frage des Heparingehaltes der Blutmastzellen des Menschen. Acta haemat. 10, S. 26-31 (1953)

28. MERKER, H.-J.: Struktur und Funktion der Lysosomen. Materia Medica Nordmark, 17/15, S. 684-699 (1965)

29. MISSMAHL, H. P.: Doppelbrechung in Leukozyten des peripheren menschlichen Blutes nach Supravitalfärbung mit Toluidinblau. Blut 12, S. 159-163 (1966)

30. MISSMAHL, H. P.: Der feinstrukturelle Aufbau der Granula basophiler Leukozyten des menschlichen Blutes. Blut 12 S. 149-158 (1966)

31. MISSMAHL, H. P.; A. ROLL:
Beitrag zur Zytologie des strömenden Blutes bei Tumorkranken. Med. Klinik 59, S. 47-49 (1964)

32. NAEGELI, O.: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik, Lehrbuch der klin. Haematologie. 4. Aufl. Springer Verlag Berlin, S. 122 (1923)

33. NOVIKOFF, A. B.:
Lysosomes in the physiology and pathology of cells, contributions of staining methods. Lysosomes, J.A. Churchill, London, S. 36-73 (1963)

34. ROHR, K.: Das menschliche Knochenmark. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Aufl. S. 121-125 (1949)

35. ROHR, K.: Zur Differenzierung der neutrophilen Leukozyten. Acta haemat. 1 S. 98-108 (1948)

36. ROHR, K.: Tabulae haematologicae. G. Thieme Verlag, Stuttgart (1956)

37. SALOMONSEN, L.: Lehrbuch der Pädiatrie, 7. Aufl. Schwabe Co Verlag, Stuttgart, herausgeg. v. G. Fanconi u. A. Wallgren S. 258-261 (1963)

38. SCHMID, G.: Kernsegmentierung und Ausmaß der Doppelbrechung im Protoplasma neutrophiler Leukozyten des peripheren menschlichen Blutes nach Supravitalfärbung mit Toluidinblau. Dissertation, Tübingen (1966)

39. SCHULTEN, H.: Lehrbuch der klin. Hämatologie. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Aufl. S. 272 (1953)

40. STORTI, E.; L. BELLESIA; E. LUSVARGHI: The Mechanical Resistance of Human Leukocytes. Acta haemat. 17, S. 333-337 (1957)

41. THOMA, K.; A. WIERCINSKI: Untersuchungen über die Funktion der Granula der basophilen Leukozyten. DMW 75, S. 86-87 (1950)

42. THONNARD-NEUMANN, E.: Studies of basophils. Acta haemat. 30, S. 221-228 (1963)

43. ULLRICH, O.: Lehrbuch der Kinderheilkunde, begr. von E. Feer, herausgeg. von H. Klein= schmidt, 19. Aufl. S. 99 (1959)

44. UNDRITZ, E.; E. ROTHLIN: Hämatologische Tafeln Sandoz. S.49

45. ZACH, J.: Über morphologische Veränderungen der Myelopoese im Mark und im peri= pheren Blut unter Einwirkung von Thio-Tepa. Wiener Zeitschrift für Innere Medizin 44, S. 51-55 (1963)

Lebenslauf:

Am 5. September 1941 wurde ich, Walter Ebner, als Sohn des praktischen Arztes, Dr. med. Walter Ebner, und seiner Ehefrau Annemarie, geborene Klickermann, in Altshausen (Württ.) geboren.
Nach der Volksschule in Altshausen besuchte ich die vier Klassen des dortigen Progymnasiums. Die letzten fünf Jahre vor dem Abitur war ich im Internat, im Aufbaugymnasium Michelbach an der Bilz, wo ich am 9. März 1961 das Abitur bestand.
Ich begann das Medizinstudium in Freiburg, wo ich nach zwei Semestern das Vorphysikum ablegte. Nach dem Vorphysikum wechselte ich die Universität und studierte weitere vier vorklinische Semester in Tübingen, wo ich im April 1964 das Physikum bestand. Mein erstes klinisches Semester verbrachte ich in Hamburg, die weiteren fünf in Tübingen. **Am 1. August 1967 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen.**

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen